

张艳华,王 惠,王 岩,等. 辽宁省慢生根瘤菌的系统发育多样性[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):67-70.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.018

辽宁省慢生根瘤菌的系统发育多样性

张艳华¹,王 惠²,王 岩³,Muhammad I⁴,黄玉茜¹,韩 梅¹,杨劲峰¹,韩晓日¹,白洪志¹

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院,辽宁沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学生物科技学院,辽宁沈阳 110866;

3. 沈阳农业大学外语教学部,辽宁沈阳 110866; 4. 旁遮普大学动物部,巴基斯坦拉合尔)

摘要:花生是重要的豆科经济作物,能与慢生根瘤菌属的根瘤菌共生固氮,辽宁省的花生种植较广泛,但是对该地区花生根瘤菌的研究并不全面。采用 16S rDNA 和 *niH* 基因的序列分析方法从遗传学角度对 17 株分离自辽宁省不同地区的花生根瘤菌的特性进行研究。根据 16S rDNA 基因的序列分析将所有菌株分为 4 个类群,而 *niH* 基因的序列分析方法将供试菌株分成两大类群,2 种方法的分类结果大体一致,测序结果表明所有菌株都属于慢生根瘤菌属。说明辽宁省花生慢生根瘤菌的分布可能与该地的地理环境存在一定的相关性。

关键词:花生;慢生根瘤菌;系统发育多样性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0067-04

根瘤菌是能与豆科植物的根部组织建立共生固氮系统的土壤微生物,通过此共生固氮系统固定的氮素量对于陆地生态系统来说非常重要^[1-2],而且有利于农业、林业和退化土地复垦的可持续发展^[3]。通常认为,共生根瘤菌分布于 α -变形菌门的根瘤菌属、慢生根瘤菌属、中华根瘤菌属、中慢生根瘤菌属、异根瘤菌属和固氮根瘤菌属^[4],但是随着根瘤菌分类学的发展,目前已经发现一些属于 β -变形菌门的根瘤菌,例如伯克氏菌属和贫铜菌属的微生物^[5]。

花生(*Arachis hypogaea* L.)别称落花生,是一种重要的农业和经济豆科作物,可被用作粮食作物、油料作物和用于生产多种食品,通常认为可与慢生根瘤菌共生进行固氮,其耐旱性、固氮能力和耐阴性使其成为与玉米、高粱、谷子和其他禾

本科作物进行间作的重要豆科植物^[6]。我国是世界上花生的进出口大国,花生产业的发展对于增加农民收入、促进国内食品安全发展和改善人们生活水平有重要的意义。

共生固氮效力是衡量花生与本土根瘤菌共生系统的重要因素。在花生种植上接种根瘤菌有很好的固氮效果,然而固氮效果受所接种根瘤菌与本土根瘤菌间的竞争影响很大^[7],因此,从本地筛选出具有结瘤、固氮和高效竞争能力的根瘤菌菌株非常重要^[8]。然而,尽管花生在辽宁省种植较广泛,但是关于本地根瘤菌系统发育多样性的相关报道并不多,本研究的目的在于通过对 16S rDNA 和 *niH* 基因序列差异性分析,对本地花生根瘤菌的特性、种群和系统发育多样性进行研究,评估地理变异,有助于改善豆科作物接种根瘤菌、提高固氮量的策略^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 菌株的采集

本研究所用菌株的来源和地理环境列在表 1 中。所选菌株直接分离自辽宁省不同地理区域所种植的花生根瘤中,每株植物上随机采集 1~2 个红色根瘤,从根瘤中分离细菌的方法如下:根瘤用 95% 乙醇表面消毒 30 s,随即在 0.1% HgCl₂

收稿日期:2015-06-09

基金项目:国家花生产业技术体系专项(编号:CARS-14-土壤肥料)。

作者简介:张艳华(1990—),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士研究生,主要从事农业微生物、微生物生态学方面的研究。E-mail:zhangyanhuahsd@163.com。

通信作者:白洪志,博士,副教授,硕士生导师,主要从事微生物生态学方面的研究。E-mail:baihongzhi2003@sina.com。

[10]李 猛,郭大龙,刘崇怀,等. 葡糖 EST-SNP 位点的信息与特征[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2012,38(3):263-270.

[11]Wang S,Sha Z,Sonstegard T S,et al. Quality assessment parameters for EST-derived SNPs from catfish[J]. BMC Genomics,2008,9:450.

[12]Fornage M,Doris P A. Single-nucleotide polymorphism genotyping for disease association studies[J]. Methods in Molecular Medicine,2005,108:159-172.

[13]Gu Z,Hillier L,Kwok P Y. Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace[J]. Human Mutation,1998,12(4):221-225.

[14]Buetow K H,Edmonson M N,Cassidy A B. Reliable identification of large numbers of candidate SNPs from public EST data[J]. Nature Genetics,1999,21(3):323-325.

[15]刘新龙,毛 钧,陆 鑫,等. 甘蔗 SSR 和 AFLP 分子遗传连锁图谱构建[J]. 作物学报,2010,36(1):177-183.

[16]Zhao W,Wang J,He X,et al. BGI-RIS:an integrated information resource and comparative analysis workbench for rice genomics[J]. Nucleic Acids Research,2004,32:D377-D382.

[17]刘学军,闫双勇,刘小红,等. 植物 SNP 数据库及转化 CAPS 的方法[J]. 分子植物育种,2006,4(3):443-447.

[18]Duran C,Appleby N,Vardy M,et al. Single nucleotide polymorphism discovery in barley using autoSNPdb[J]. Plant Biotechnology Journal,2009,7(4):326-333.

[19]Nasu S,Suzuki J,Ohta R,et al. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice and establishment of SNP markers[J]. DNA Research,2002,9:163-171.

溶液中浸泡 3~5 min,然后用无菌蒸馏水洗涤 5~6 次,夹破根瘤并在含有刚果红的酵母浸出物-甘露醇培养基(YMA)平板上划线^[11],将平板置于 28℃ 条件下培养 2~7 d 长出单菌落,随后挑取长出的分离物,经过稀释涂布皿纯化,挑取单菌落,-80℃ 冰冻保存在含有 20% 甘油的 YMA 液体培养基中^[7]。根据菌株较慢的生长速度和在含有溴麝香草酚蓝(BTB)的 YMA 平板上产碱(培养基由草绿色变为蓝色)初步推断属于慢生根瘤菌属^[12]。通过结瘤试验验证菌株是否具有使花生结瘤的能力。

表 1 菌株的采集地和样地的环境条件

菌株	地点	位置	地形	气候条件
P、J	阜新市	西部	山地和丘陵	温带半干旱半湿润气候
B	黑山县	西部	平原和丘陵	温带大陆性季风气候
G	兴城市	西南	丘陵	温带季风性气候
F	康平县	北部	平原和丘陵	温带大陆性气候
H	法库县	北部	平原和丘陵	温带大陆性季风气候
O	沈阳市	中部	平原	温带半湿润大陆性气候
C、E	辽中县	中南部	平原	温带半湿润大陆性气候
4	辽阳市	中南部	平原和丘陵	温带半湿润季风性气候

1.2 结瘤试验

对所有供试菌株包括从中国科学院沈阳应用生态研究所获得的参照菌株(慢生根瘤菌属的 1 024 菌株)在实验室进行盆栽结瘤试验。花生种子表面消毒的方法与前面根瘤表面消毒的方法相同^[11],置于含有湿润纱布的无菌平板中在 28℃ 条件下催芽,待胚芽长到约 2.0 cm 时,播种到装有蛭石和无氮营养液并在 121℃ 下灭菌 1 h 的玻璃罐中,每罐播种 2 粒,并在根部接种 1 mL 供试菌的菌悬液(约 0.1 亿个细胞/mL),每个处理设置 5 个重复并设置空白对照。将盆栽置于特定的环境下培养(28℃,每天光照 16 h,相对湿度 50%),适当补浇无菌水,每月浇 2 次无氮营养液^[11]。接种 45 d 后收获植株,记录每个处理的结瘤数。内部呈现红色的根瘤视为有效根瘤。

1.3 DNA 提取

提取 DNA 前,将供试菌株在 YMA 平板上划线活化,28℃ 培养至长成单菌落,挑取单菌落接种到 YMA 液体培养基中至对数期($0.4 < D_{600\text{ nm}} < 0.6$)用于提取总 DNA,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN,北京)提取 DNA。

1.4 PCR 扩增和 16S rDNA 基因序列测定

选取每一样地的代表菌株,DNA 提取后,用引物 rD1(5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 rD1(5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATC-CAGCC-3')扩增 16S rDNA 基因。PCR 程序按照 Weisburg 等的方法^[9]操作,在 1% 琼脂糖凝胶电泳上进行 PCR 产物效果检测,凝胶成像系统拍照,效果较好的产物送至生物公司进行测序。

1.5 PCR 扩增和 *nifH* 基因序列测定

由于 *nifH* 基因编码固氮还原酶,为了研究根瘤菌的共生特性,笔者分析了 *nifH* 基因,用特异性引物 *nifHF*(5'-TACG-GNAARGSGGNATCGGCAA-3')和 *nifHR*(5'-AGCATGT-CYTCSAGYTCNT CCA-3')扩增 *nifH* 基因,PCR 程序参考 Gurkanli 等的研究^[13]。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检测,凝胶成像系统拍照,送至生物公司进行测序。

1.6 系统发育分析

通过 NCBI 上的 BLAST 工具进行菌株的同源性分析,在 BLAST 数据库获取相似序列以及慢生根瘤菌属参比菌株的基因序列,用 MEGA 4.0 软件的 CLUSTAL W 功能进行相似性比对^[14],序列比对后,用 MEGA 4.0 采用邻接法构建系统发育树^[15]。发育树的自展检验对每个序列随机选取 500 个重复来评估发育树拓扑学的可靠性,用 Kimura 2-Parameter 模型(K_2P)来计算基因间距离。

1.7 核苷酸序列入库编号

12 个菌株的 16S rDNA 基因的核苷酸序列和 17 个菌株的 *nifH* 基因的核苷酸序列存放在 GenBank 中,序列编号分别为 KR092316-KR092327 和 KR092328-KR092344。

2 结果与分析

2.1 菌株的生长性能

本研究中的所有供试菌株都能使花生结瘤,初步证明这些菌株都属于根瘤菌。28℃ 条件下,供试菌株在 YMA 平板上长出单菌落约需要 1 周的时间,菌落呈乳白色,不透明或半透明,边缘光滑,所有菌株因产生碱性物质而使含有 BTB 的 YMA 培养基平板由草绿色变为蓝色(图 1)。这一结果进一步表明供试菌株属于慢生根瘤菌属。

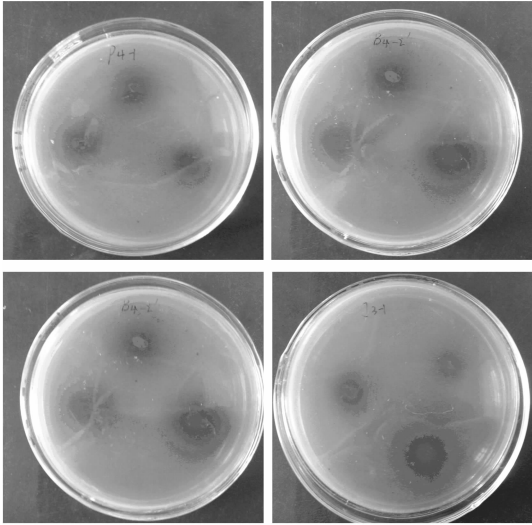
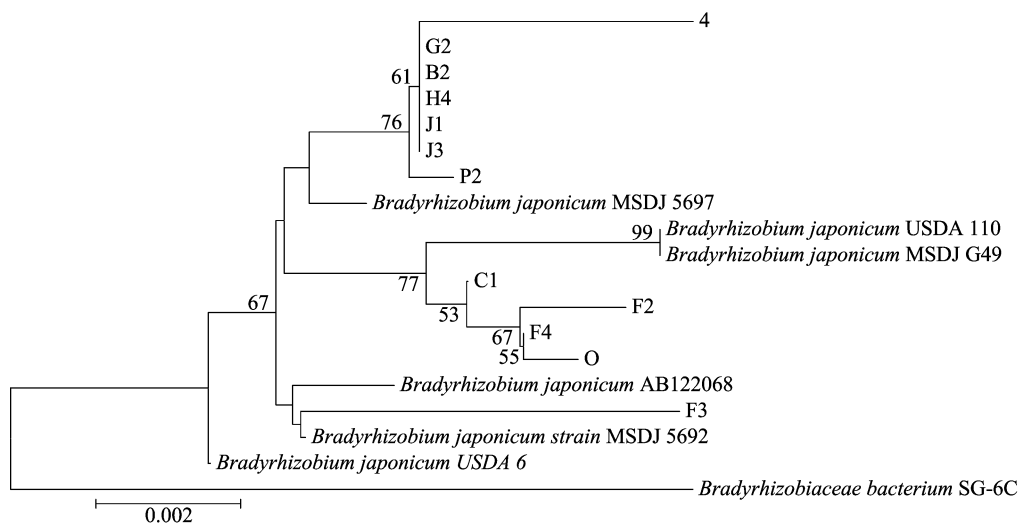


图 1 在含有 BTB 的 YMA 平板上产生的颜色变化(由草绿色变为蓝色)

2.2 16S rDNA 的系统发育分析

每个供试菌株的 16S rDNA 基因 PCR 扩增后都产生约 1.45 kb 的单一一条带。对从不同地区采集的 12 株代表菌株的 16S rDNA 序列的 BLAST 进行分析,结果表明它们都属于慢生根瘤菌属,与 *Bradyrhizobium japonicum* 有最大的相似性。

根据辽宁省本土花生慢生根瘤菌 16S rDNA 基因序列所做的系统发育分析结果见图 2。与最相近的参考菌株有至少 97% 的序列相似性作为菌株分群的标准,在 16S rDNA 基因的系统发育分析中,所有菌株被分为 4 个类群,不同地区菌株的区别显示在系统发育树上(图 2)。所分成的 4 个类群都与 *B. japonicum* 有较高的序列相似性,F3 属于类群 I,它分离自辽宁省的北部,与 *B. japonicum* USDA6 最相近,相似性达到 99%;C1、F2、F4 和 O 属于类群 II,它们分离自辽宁省的北部和中部。菌株 B2、H4、G2、J1、J3 和 4 被归为类群 III,除了 H4



比例尺表示该处的核苷酸替代数，自展值（500个重复）大于50%的显示在节点处；图3同

图2 根据16S rDNA核苷酸序列比对结果通过邻接法构建系统发育树

分离自辽宁省的北部,其余的都是辽宁省的西部地区采集的;仅 P2 菌株归为类群Ⅳ,它分离自辽宁省的西部。由于采集自同一地区的菌株样本有被归到不同类群的现象,16S rDNA类型与地理位置的相关性不太明显,但仍然有一定的相关性。

2.3 *nifH* 基因的系统发育分析

每一菌株的 *nifH* 基因 PCR 产物均产生约 0.75 kb 的单一一条带。对 17 株菌株测序结果进行 BLAST,都显示与慢生根瘤菌属的菌株有较高的同源性。根据辽宁省本土花生慢生根瘤菌 *nifH* 基因序列测定结果所进行的系统发育分析见图 3。

以与最近的参考菌株有不少于 97% 的序列相似性作为菌株分群的标准,系统发育树可分为两大类群,都属于 *B. japonicum*,与 *B. japonicum* USDA110 有至少 97% 的序列相似性,每一类群与相应地理区域大致对应。类群 A 的菌株包括 P2、H4、4、F3、F4、O1、F1、F2、C1,属于北部和中部气候区,类群 B 菌株包括 B3、B4、B1、B2、E1、J1、G2、J3,分离自西部和中部地区。与 16S rDNA 基因序列分析相比,*nifH* 基因的共生基因类群 A 对应 16S rDNA 基因类群 I、II、IV,*nifH* 基因类群 B 与 16S rDNA 基因类群 III 相对应,都属于 *B. japonicum*。

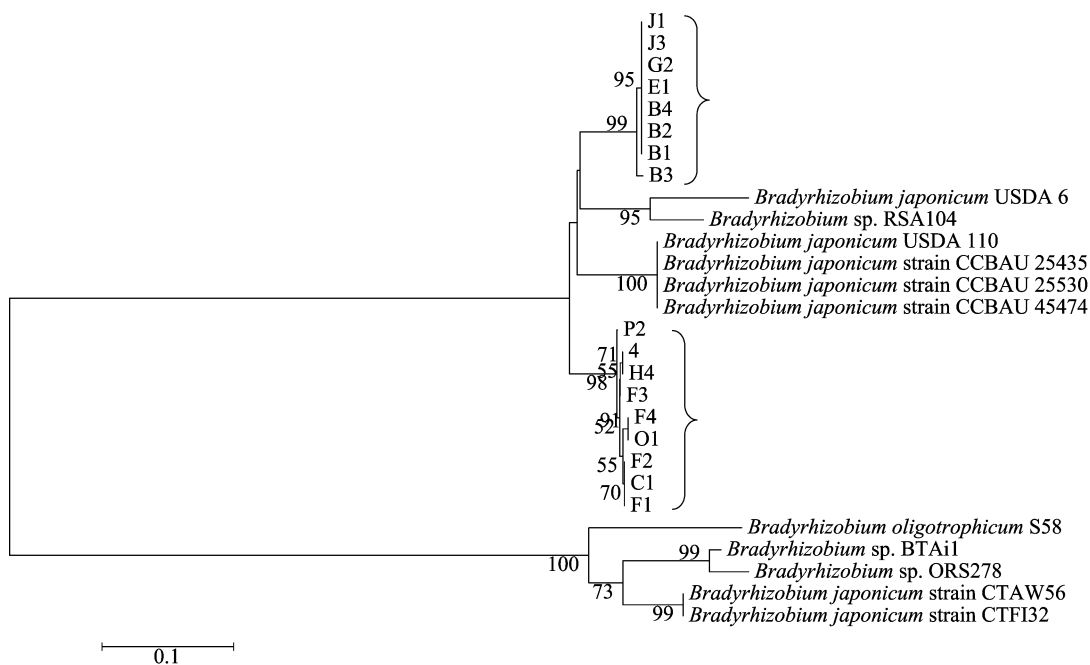


图3 依据 *nifH* 基因核苷酸序列比对结果通过邻接法构建系统发育树

3 结论与讨论

在本研究中,从辽宁省不同地区的花生种植区分离出 17 株根瘤菌,依据回接结瘤能力、在含有 BTB 的 YMA 平板上产生碱性物质的能力、16S rDNA 和 *nifH* 基因序列分析的结果,

这些菌株都被归为慢生根瘤菌属。16S rDNA 基因和管家基因常被用作分子系统学分类和评估慢生根瘤菌系统发育关系的标记。本研究中,通过 16S rDNA 和 *nifH* 基因序列分析证明 17 株菌株都属于 *B. japonicum*,即 *B. japonicum* 是辽宁省慢生根瘤菌的优势种。辽宁省的地势北部高,南部地,从陆

地向海洋倾斜,可以大致的分为 3 个地理区域:西部高地、中部平原、东部丘陵。因此,地势的差异可能影响本土根瘤菌的分布,在本研究中,依据 16S rDNA 基因的系统发育分析,供试菌株被分为 4 个类群,所有类群都与 *B. japonicum* 有较高的序列相似性,而依据 *nifH* 基因序列的系统发育树将供试菌株分类两大类,在这 2 种系统发育树间有较大的相似性,与 16S rDNA 基因序列分析相比,*nifH* 基因的共生基因类群 A 对应 16S rDNA 基因类群 I、II、IV,*nifH* 基因类群 B 与 16S rDNA 基因类群 III 相对应,从每一类群中菌株的分布可以推测地理因素与本土根瘤菌的分布有一定的相关性。

然而,由于每一样地取样量相对较小,降低了供试菌株的数量,可能低估了辽宁本地慢生根瘤菌的生物多样性。尽管有些研究报道了有快生根瘤菌使花生结瘤的现象^[16-17],但与花生共生结瘤的菌株大部分都属于慢生根瘤菌^[18-20],在本研究中,从花生根瘤中只分离出慢生根瘤菌,并未见快生菌结瘤的现象。

有研究显示,根瘤菌的分布、多样性和本土性受土壤类型和气候环境影响^[11,21-22]。在对大豆所作的研究中,温度和土壤 pH 值与尼泊尔地区根瘤菌种水平的分布有很大的相关性^[10]。Dinesh 等也报道了尼泊尔地区不同地理环境豇豆根瘤菌的分布多样性^[23]。

总之,尽管本研究中供试菌株的多样性并不高,但是也对辽宁省不同地理区域本土花生慢生根瘤菌系统发育多样性进行的初步分析。结果显示,辽宁省花生慢生根瘤菌可能依赖于地理位置而分布,这也暗示本土慢生根瘤菌的分布与环境因素间的相关性。在今后的工作中,有必要增大采样量对辽宁地区花生根瘤菌多样性进行深入研究。

参考文献:

- [1] Cleveland C C, Townsend A R, Schimel D S, et al. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N_2) fixation in natural ecosystems[J]. Global Biogeochem, 1999, 13: 623 - 645.
- [2] Sprent J. Legume Nodulation: a global perspective [M]. Oxford: Wiley Blackwell, 2009: 183.
- [3] Dresler - Nurmi A, Fewer D P, Räsänen L A, et al. The diversity and evolution of rhizobia[J]. Microbiol Monogr, 2009, 8: 3 - 41.
- [4] Mahmood A, Athar M. Cross inoculation studies: response of vigna mungoto inoculation with rhizobia from tree legumes growing under arid environment[J]. Int J Environ Sci Tech, 2008, 5(1): 135 - 139.
- [5] Ampomah O Y, Huss - Danell K. Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34 (4): 267 - 275.
- [6] Zhang Y F, Wang E T, Tian C F, et al. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 285(2): 146 - 154.
- [7] Taurian T, Aguilar O M, Fabra A. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba[J]. Argentina Symbiosis, 2002, 3: 59 - 72.
- [8] Vincent M. A manual for the practical study of root nodule bacteria [M]. Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [9] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697 - 703.
- [10] Adhikari D, Kaneto M, Itoh K, et al. Genetic diversity of soybean - nodulating rhizobia in Nepal in relation to climate and soil properties [J]. Plant and Soil, 2012, 357(1/2): 131 - 145.
- [11] Muñoz V, Ibañez F, Tonelli M L, et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of native peanut *Bradyrhizobium* isolates obtained from Córdoba, Argentina[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(6): 446 - 452.
- [12] Sharma M P, Srivastava K, Sharma S K. Biochemical characterization and metabolic diversity of soybean rhizobia isolated from Malwa region of Central India [J]. Plant Soil and Environment, 2010, 56(8): 375 - 383.
- [13] Gurkanli C T, Ozkoc I, Gunduz I. Genetic diversity of *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. nodulating rhizobia in the central Black Sea region of Turkey [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64 (1): 99 - 112.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596 - 1599.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor - joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406 - 425.
- [16] 何庆元, 王永雄, 何华奇, 等. 安徽地区花生根瘤菌遗传多样性的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 542 - 546.
- [17] Liu J, Wang L L, Wang E T, et al. Phylogenetic diversity of rhizobia isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) grown in Hebei[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(2): 344 - 352.
- [18] El - Akhal M R, Rincon A, Mourabit N E, et al. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Moroccan soils[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(5): 415 - 425.
- [19] Taurian T, Ibañez F, Fabra A, et al. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean soils[J]. Plant and Soil, 2006, 282(1/2): 41 - 52.
- [20] El - Akhal M, Rincon A, Arenal F, et al. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco[J]. Soil Biol Biochem, 2008, 40: 2911 - 2914.
- [21] Nievas F, Bogino P, Nocelli N. Genotypic analysis of isolated peanut - nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories [J]. Applied Soil Ecology, 2012, 53: 74 - 82.
- [22] Han T X, Wang E T, Han L L, et al. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31(4): 287 - 301.
- [23] Adhikari D, Itoh K, Suyama K. Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulating rhizobia in Nepal [J]. Plant Soil, 2013, 368: 341 - 353.